

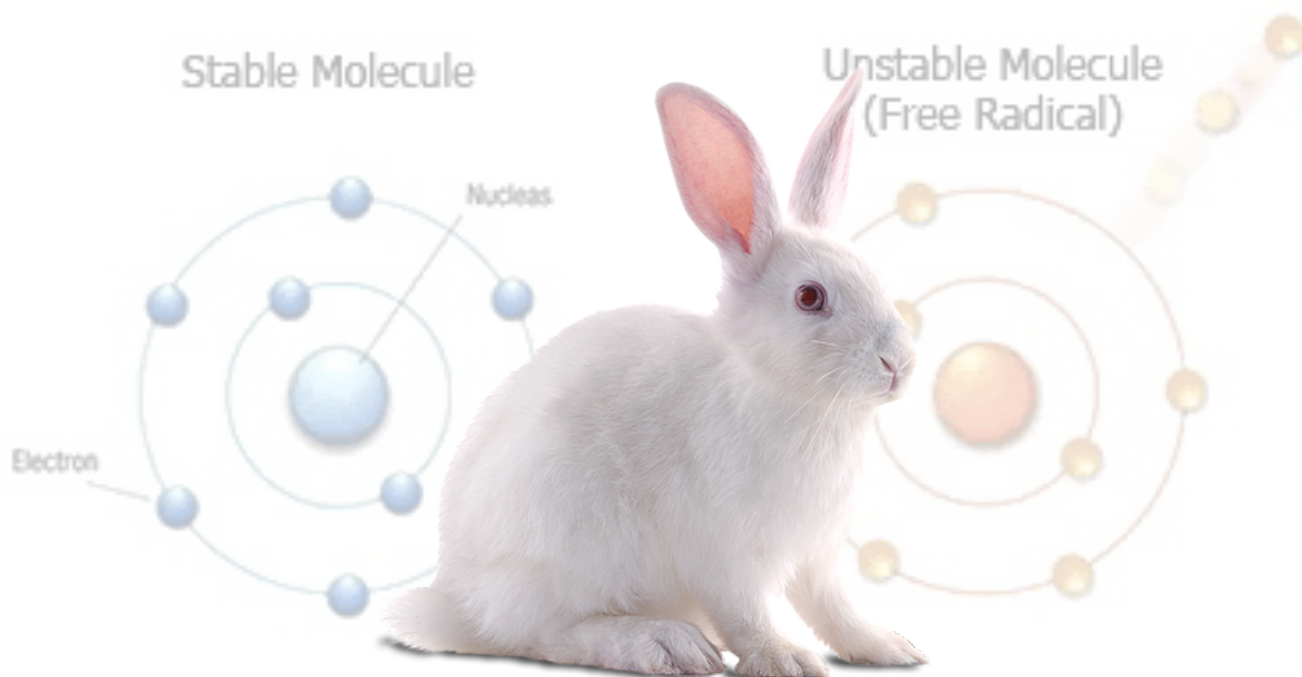


Facultad de Veterinaria  
**Universidad Zaragoza**



Escuela de  
Ingeniería y Arquitectura  
**Universidad Zaragoza**

# **Caracterización experimental y simulación computacional de un modelo de oxidación *in vitro***



**Lorena Bragg Gonzalo**

Trabajo Fin de Grado

Biotecnología: Facultad de Ciencias

Zaragoza, 2015

Directores: Francisco Javier Miana, David González Ibáñez y Jorge Grasa Orús



**FRANCISCO JAVIER MIANA**, Profesor Titular del Departamento de Farmacología Fisiología de la Universidad de Zaragoza,

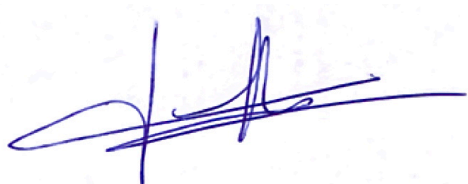
**DAVID GONZÁLEZ IBÁÑEZ**, Profesor Titular del Departamento de Ingeniería Mecánica de la Universidad de Zaragoza,

**JORGE GRASA ORÚS**, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Ingeniería Mecánica de la Universidad de Zaragoza,


CERTIFICAN:

Que **Lorena Bragg Gonzalo** ha realizado el trabajo presentado bajo el título “Caracterización experimental y simulación computacional de un modelo de oxidación tisular *in vitro*” en el Departamento de Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza, bajo nuestra dirección, autorizando su presentación.

Zaragoza, 26 de junio de 2015



Francisco Javier Miana Mena



David González Ibáñez



Jorge Grasa Orús



# Índice

---

<b>Abstract/ resumen</b> .....	pág. 5
<b>1. Antecedentes</b> .....	pág. 7
1.1. Radical libre .....	pág. 7
1.2. Fuentes de radicales libres en los seres vivos. ....	pág. 7
1.3. Efecto beneficioso .....	pág. 9
1.4. Efecto nocivo .....	pág. 9
Daño oxidativo a los ácidos nucleicos	
Daño oxidativo a las proteínas	
Daño oxidativo a los lípidos	
1.5. Antioxidantes .....	pág. 11
1.6. Estrés oxidativo .....	pág. 12
Implicaciones fisiológicas	
Patología	
1.7. Modelo .....	pág. 13
<b>2. Objetivos</b> .....	pág. 15
2.1. Objetivos del grupo de investigación	
2.2. Objetivos específicos	
2.3. Objetivo general	
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	pág. 16
3.1. Dispositivo experimental .....	pág. 16
Perfusión y obtención tisular	
3.2. Oxidación <i>in vitro</i> . ....	pág. 16
3.3. Determinación del daño oxidativo .....	pág. 17
3.4. Determinación de la actividad antioxidante total .....	pág. 18
3.5. Estadística. ....	pág. 18
3.6. Composición tisular .....	pág. 18
<b>4. Resultados y discusión</b> .....	pág. 19
4.1. Actividad antioxidante y composición tisular .....	pág. 19
4.2. Oxidación de tejidos <i>in vitro</i> .....	pág. 19
Hígado	
Riñón	
Corazón	
Músculo	
Cerebro	
Estrés oxidativo y características intrínsecas del tejido	
<b>5. Conclusiones/ conclusions</b> .....	pág. 26
<b>Bibliografía</b> .....	pág. 28
<b>Anexos</b> .....	pág. 31



## Abstract

---

Oxidative stress is consequence of the imbalance between antioxidant defenses and reactive oxygen species (ROS, free radicals derived of aerobic metabolism) in living organisms. It has a deleterious effect on every cell structures, being lipids particularly susceptible. It is involved in the pathogenesis of many diseases and situations such as aging, fatigue and so on. Its deep relationship with these processes has promoted the study of possible antioxidant treatments. Nevertheless, the obtention of useful results requires a vast number of experiments, with the resulting cost, not only economic but also in laboratory animals. A possibility to minimize these costs is to develop a numerical prediction model.

An oxidation *in vitro* model based on the generation of  $\cdot\text{OH}$  through Fenton reaction (promoted by  $\text{FeCl}_3$  and ascorbic acid) was used in the present work on homogenates of New Zealand White rabbits liver, kidney, heart, muscle and brain. Afterwards, the concentration of MDA+4-HDA was measured as a biomarker of lipid peroxidation. The working hypothesis is that the oxidation degree of each tissue depends on the time and concentration of  $\text{FeCl}_3$  to which it is exposed as well as its fat composition and antioxidant power.

The ultimate objective of this project is to obtain the empirical data needed for the creation of a mathematical prediction model which will allow to anticipate the oxidation degree of a tissue (defined by its fat composition) exposed to Fenton reaction and the studied antioxidant. This tool would minimize the use of experimental animals in the research of possible treatments in processes related to oxidative stress.

## Resumen

---

El **estrés oxidativo** es consecuencia de la ruptura del equilibrio entre las defensas antioxidantes y los radicales libres de oxígeno (subproductos del metabolismo aerobio) en un organismo vivo. Tiene un efecto nocivo sobre todas las estructuras celulares, siendo los lípidos especialmente susceptibles. Está implicado en la etiopatogenia de numerosas enfermedades y situaciones como el envejecimiento, la fatiga, etc. Su profunda relación con dichos procesos ha promovido el estudio de posibles tratamientos antioxidantes. Sin embargo, la obtención de resultados útiles requiere una gran cantidad de experimentos, con el consiguiente coste, no solo económico, sino también en animales de laboratorio. Una posibilidad para minimizarlos es elaborar un modelo numérico de predicción.

En el presente TFG se empleó un modelo de oxidación *in vitro* basado en la generación de  $\cdot\text{OH}$  por medio de la reacción de Fenton (potenciada por  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico) sobre homogeneizados de hígado, riñón, corazón, músculo y cerebro de conejos blancos de Nueva Zelanda. Posteriormente, se midió la concentración de MDA+4-HDA como indicador del grado de lipoperoxidación tisular. La hipótesis de trabajo es que el grado de oxidación de cada tejido dependerá del tiempo y concentración de  $\text{FeCl}_3$  al que se exponga, así como de su composición de grasa y poder antioxidante.

El objetivo final del proyecto es la obtención de los datos empíricos necesarios para la creación de un modelo matemático de predicción que permita anticipar el grado de oxidación de un tejido cualquiera (definido por su composición grasa) expuesto a la reacción de Fenton y al antioxidante que se desea estudiar. Esta herramienta minimizaría la utilización de animales de experimentación en el estudio de posibles tratamientos de procesos en los que intervenga el estrés oxidativo.





# 1. Antecedentes

---

Las causas del daño producido por el oxígeno no estaban claras antes de la publicación de la **teoría de la toxicidad de los radicales libres de O<sub>2</sub>** (ROS) de Gerschman en 1954; según la cual está producida por una determinada forma reducida del oxígeno.

Dos años más tarde Denham Harman propuso por primera vez la idea de que los ROS juegan un papel importante en el proceso de envejecimiento (Harman, 1956). Este trabajo impulsó una intensa investigación en el campo de los radicales libres en sistemas biológicos. Así, se reveló que los seres vivos no solo se han adaptado a coexistir con los ROS, sino que han desarrollado mecanismos para aprovecharlos en sus funciones fisiológicas.

Tanto los ROS como los radicales libres de nitrógeno (RNS) son productos normales del metabolismo y, en función de su proporción, pueden ser dañinos o beneficiosos. El balance oxidativo se mantiene, en condiciones normales, gracias a una serie de mecanismos conocidos como “**regulación redox**” (Valko et al., 2007).

## 1.1 Radical libre

El átomo está compuesto por un núcleo formado por protones y neutrones alrededor de los cuales existe una corteza de electrones dispuestos en orbitales. Esto es, regiones del espacio donde existe una mayor probabilidad de encontrar al electrón.

Los electrones tienen distintos niveles energéticos, dependiendo de los cuales se distribuyen en un tipo de orbital u otro. En cada uno de ellos, puede haber hasta dos electrones girando sobre su propio eje, lo que genera una energía magnética que viene determinada por el cuarto número cuántico o de *spin* que puede representarse por  $\pm 1/2$  según el sentido del giro sea horario (+) o antihorario (-).

Si en un orbital se encuentran dos electrones apareados, sus sentidos de giro son opuestos y las energías que producen se anulan entre sí. A ese átomo o molécula se le denomina **diamagnética**.

En contraposición, un electrón desapareado tiene un momento magnético no compensado denominado “**magnetón de Bohr**” el cual determina que el átomo o molécula sea **paramagnética**. Así pues, desde el punto de vista químico un radical libre es toda especie química, átomo, molécula o parte de ella, cargada o no, que en su estructura presenta uno o varios electrones desapareados o impares en su orbital más externo, dándole una configuración electrónica que genera gran inestabilidad (Venereo Gutiérrez, 2002).

El radical libre tiende a recuperar la situación de estabilidad cediendo el electrón a un agente reductor o captándolo de un agente oxidante. De esta manera, el radical libre se estabiliza al mismo tiempo que se desestabiliza la especie con la que reacciona. El tiempo que tarda en producirse este intercambio de electrones determina la vida media de los ROS.

## 1.2 Fuentes de radicales libres en los seres vivos

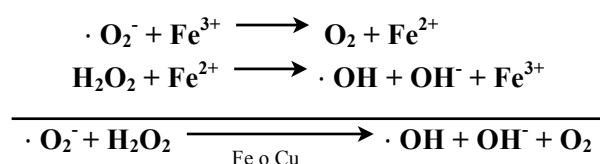
El oxígeno es utilizado por los organismos aerobios como aceptor final de electrones durante el proceso de la respiración mitocondrial para generar ATP. En esta ruta es inevitable la formación de subproductos a partir del O<sub>2</sub>. Esta es la denominada **paradoja del oxígeno**, pues es una molécula imprescindible para la vida y al mismo tiempo productora de sustancias letales.

El doble enlace covalente de la molécula de O<sub>2</sub>, permite estabilizar la especie de manera que cumple la **regla del octeto**. Sin embargo, esta configuración electrónica se modifica con la adición de electrones. La transferencia de los mismos directamente sobre el O<sub>2</sub> origina los **ROS primarios**: O<sub>2</sub><sup>·-</sup> y ·OH caracterizados por tener una vida media muy corta.

El **radical del anión superóxido** (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>) es el más común, formado por medio de la “activación” a través de irradiación (Miller et al., 1990) o como subproducto de procesos metabólicos. La mayor parte surge en la mitocondria durante la fosforilación oxidativa, principalmente en los complejos I y III (Cross & Jones, 1991).

El O<sub>2</sub><sup>·-</sup> puede interaccionar con otras moléculas para generar **ROS secundarios** (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HClO) ya sea de manera directa o por medio de una catálisis mediada por algún metal o enzima.

Por su parte, el **radical hidroxilo** (·OH) es el más reactivo. No tiene un gran poder de difusión; puede generarse en contadas ocasiones por la fisión homolítica del agua debida a la radiación de alta energía (rayos X, rayos γ), la ruptura fotolítica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o la **reacción de Fenton-Haber Weiss** (Fenton, 1894; Haber & Weiss, 1934) en la que una molécula de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reacciona con un agente reductor, para producir ·OH, OH<sup>-</sup> y O<sub>2</sub>.



Las enzimas dependientes de NADH son también fuente de radicales libres en la mitocondria. La interacción de algunos metales, los hidroxiperoxidos o el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> con estas enzimas produce la alteración de los sistemas por el proceso anterior y el envejecimiento mitocondrial (Bindoli, 1988).

También es productora de ROS la β-oxidación de los ácidos grasos; ya sea en la matriz mitocondrial, o en los peroxisomas, como en el caso de los hepatocitos, donde son responsables del metabolismo de sustancias tóxicas.

También en el hígado (e intestino) hay una gran abundancia de citocromos P<sub>450</sub>, una amplia familia de hemoproteínas localizadas en el retículo endoplasmático y la mitocondria que catalizan reacciones de hidroxilación, consiguiendo que las sustancias tóxicas sean más hidrosolubles, de manera que puedan ser más fácilmente eliminadas por orina.

La aminooxidasa y la xantina oxidasa que participan en la oxidación de monoaminas y xantinas respectivamente están implicados en la etiopatogenia de las enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Fahn & Cohen, 1992).

Por último, se sabe que durante la fagocitosis de granulocitos y del sistema monocito-macrófago se producen grandes cantidades de ·O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH (Moslen, 1994) y HClO formado por la enzima mieloperoxidasa (Babior, 1978). Pues estos radicales (producidos en el denominado **estallido respiratorio**) son usados contra la bacteria fagocitada. No obstante, en algunas ocasiones, pueden afectar a los tejidos sanos circundantes como en la artritis reumatoide (Babior, 1984).

### 1.3 Efecto Beneficioso

Los efectos beneficiosos de los ROS tienen lugar a concentraciones bajas o moderadas e influyen en las funciones fisiológicas de defensa contra agentes infecciosos, en algunas vías de señalización o incluso en la inducción de la respuesta mitógena (Valko et al., 2007).

### 1.4 Efecto nocivo

A concentraciones altas, los ROS producen daño en todo tipo de estructuras celulares y, por tanto, en la función de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos cuyas modificaciones están interrelacionadas (Figura 1).

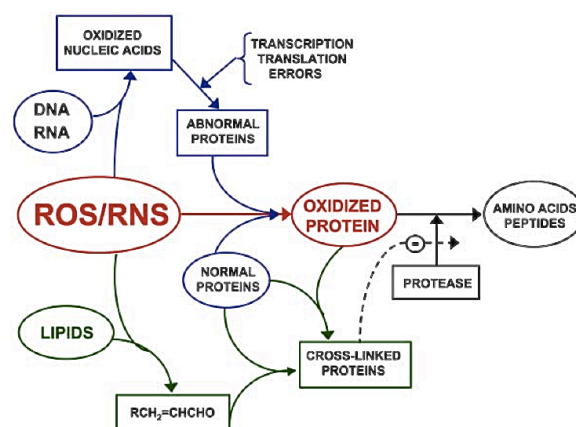


Figura 1. Interrelación entre las modificaciones de lípidos, DNA, RNA y proteínas producidas por los ROS y RNS (Stadtman, 2004)

### Daño oxidativo a los ácidos nucleicos

Si no se consiguen reparar, las formas oxidadas del DNA y RNA pueden llevar a la transcripción o traslación de los errores. Como consecuencia, hay una síntesis anormal de proteínas, más sensibles a la oxidación. Dichos polipéptidos defectuosos, son degradados por proteasas (Stadtman, 2004).

El radical hidroxilo, reacciona con todos los componentes de la molécula de DNA, esto es, tanto con las bases púricas como con las pirimidínicas e incluso con el esqueleto de desoxirribosa. La modificación más estudiada, es la formación de **8-hidroxiguanosina** (8-OH-G); una modificación permanente del material genético relacionada con la mutagénesis, carcinogénesis y el envejecimiento.

### Daño oxidativo a las proteínas

Las cadenas laterales de los aminoácidos de las proteínas, concretamente la cisteína y metionina, son susceptibles de ser oxidadas por los ROS (Stadtman, 2004). La oxidación de los residuos de Cys puede llevar a la formación reversible de puentes disulfuro entre grupos tioles (-SH) o generar tioles de bajo peso molecular, en particular GSH (**S-glutatiolación**). La concentración de grupos carbonilo, es un buen indicador de la oxidación proteica.

Por otro lado, destacan los **productos avanzados de glicosilación** (AGEs). Se trata de moléculas complejas, resultado de la reacción entre carbohidratos y grupos aminoacídicos libres de las proteínas. Los compuestos finales son difíciles de analizar y aunque los intermediarios son muy inestables sí se han logrado identificar. Destacan los productos de Amadori y Maillard y la base de Schiff (Dalle-Donne et al., 2005).

## Daño oxidativo a los lípidos

Los lípidos, principales componentes de las membranas biológicas, son las biomoléculas más susceptibles de ser atacadas por los radicales libres. En concreto, aquellas que poseen mayor número de dobles enlaces, esto es, los ácidos grasos poliinsaturados. Así pues, son las más afectadas por los ROS. Por esta razón, los experimentos llevados a cabo en el presente TFG se centran en la medida experimental del daño lipídico, ya que se trata de un excelente indicador del estado celular.

Dicho proceso, conocido como **peroxidación lipídica**, se inicia cuando un radical libre extrae un átomo de hidrógeno de la cola del ácido graso de un fosfolípido, produciéndose un reordenamiento de los dobles enlaces que da lugar a una reacción en cadena. Dichas reacciones se dividen en cuatro pasos (Figura 2):

- **Iniciación:** puede ser producida por  $\cdot\text{OH}$ ,  $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ ,  $\text{RO}\cdot$  y  $\text{ROO}\cdot$  (Kanner et al., 1987). Los cuales son capaces de atacar la cadena alifática de los lípidos extrayendo un hidrógeno de un carbono metileno (de manera que deja un electrón no apareado). Como resultado, se forma un radical lipídico.
- **Propagación:** el lípido producido es muy inestable y sufre un reajuste molecular para formar un dieno conjugado capaz de combinarse con el oxígeno para formar un radical peroxilo ( $\text{LOO}\cdot$ ) en el ácido graso.
- **Ramificación:** el  $\text{LOO}\cdot$  a su vez, reacciona con otro lípido sustrayendo otro H y dando lugar a un radical de ácido graso diferente y a un peróxido lípido o un peróxido cíclico (en caso de haber reaccionado consigo mismo).
- **Terminación:** solo ocurre cuando los radicales libres interaccionan con moléculas antioxidantes o cuando se agota el sustrato, lo que implica la muerte celular. Los ácidos grasos poliinsaturados se oxidan y se agotan, se forman uniones entre fosfolípidos o entre fosfolípidos y proteínas (Bruch & Thayer, 1983). Estas alteraciones estructurales contribuyen a la pérdida de la fluidez y, por tanto, de su función.

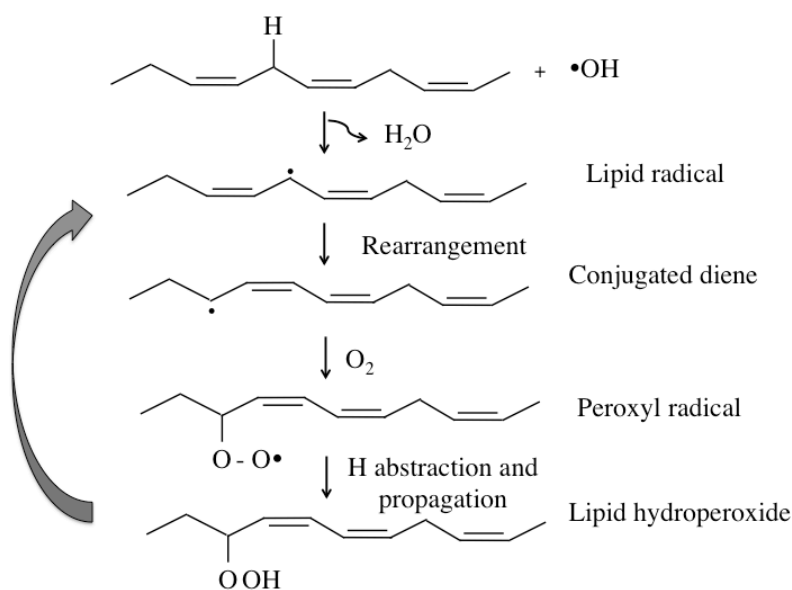


Figura 2. Desarrollo de la peroxidación lipídica (Jairam et al., 2012).

Los compuestos resultantes son relativamente estables, no obstante, su descomposición puede ser catalizada por metales de transición (como el Fe o el Cu, los más abundantes en el organismo) dando

lugar a nuevos radicales o a la formación de productos terminales de oxidación de toxicidad diversa entre los que destacan el **malonildialdehído (MDA)** y los **4-hidroxiálquenos (4-HDA)**.

Ambas moléculas son capaces de provocar modificaciones ya sea directamente, al reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos o indirectamente interfiriendo en la regulación de las vías metabólicas a través de los receptores de señalización (Wilhelm, 1989).

En cuanto al efecto sobre las membranas, la peroxidación genera cambios de fluidez, aumento de permeabilidad y disminución del potencial (Greenberg et al., 2006); afecta a las proteínas que lo integran (Zarkovic, 2003) e incluso rompen la bicapa (Halliwell & Gutteridge, 1990); lo que conlleva a la muerte celular.

### **Malonildialdehído (MDA)**

El **malonildialdehído** es el principal y más estudiado de los aldehídos que se producen en la descomposición de los peróxidos, ya que se utiliza como marcador del grado de peroxidación. Su vida media y alta reactividad le permite actuar tanto en el interior como en el exterior de las células interactuando con proteínas y DNA.

Por este motivo, su nivel (junto con el de 4-HDA) se empleó en los experimentos llevados a cabo como medida del grado de oxidación lipídica.

## **1.5 Antioxidantes**

Un antioxidante es una sustancia que, en bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente su oxidación ya que interactúa más rápidamente con los ROS que el resto de moléculas presentes en un determinado microambiente. Pueden ser endógenos (responsables del mantenimiento de las funciones celulares) u obtenidos a partir de la dieta (requeridos especialmente en situaciones que favorecen un incremento de radicales libres).

En muchas ocasiones, los antioxidantes actúan sacrificando su propia estabilidad electrónica. Para regenerarse, son capaces de interactuar entre ellos de manera que recuperan sus propiedades originales y forman la denominada **red antioxidante**.

Protegen a los tejidos y pueden clasificarse en primarios, secundarios o terciarios en dependencia de su función. Todos ellos, trabajan de manera sinérgica.

En el primer grupo, los enzimáticos, se encuentran:

- **Superóxido dismutasa (SOD)** que transforma el peróxido de hidrógeno en oxígeno. Existen diversas isoformas, que se diferencian principalmente en el metal del centro activo: Cu-SOD, Zn-SOD y Mn-SOD.
- **Catalasa:** cataliza la dismutación del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ .
- **Peroxidasa:** proteína que utiliza como oxidante el peróxido de hidrógeno y un segundo sustrato de características reductoras para transformar el  $H_2O_2$  en  $H_2O$ .
- **Proteínas de unión a metales (GR)** que frenan la disponibilidad del Fe, necesario para la formación del radical OH.
- De entre todos ellos destaca el **glutathión** (GSH cuya forma oxidada es el disulfuro de glutathión GSSG); abundante en citosol, mitocondria y núcleo (donde mantiene el estado redox de los sulfidrilos presentes en las proteínas necesarias para traducir y reparar el DNA). Sus acciones protectoras incluyen: la regeneración de los antioxidantes más importantes

(vitamina C y E), actuar como cofactor de numerosas enzimas contra el estrés oxidativo como la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatióntransferasa entre otras (Masella et al., 2005).

Dentro de los secundarios no enzimáticos, hay dos subgrupos:

- **Antioxidantes hidrofílicos:** entre los que se encuentran la vitamina C (ascorbato), ácido úrico, bilirrubina y albúmina.
- **Antioxidantes lipofílicos:** entre los que aparecen la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), carotenoides y las ubiquinonas.

Por último, están los terciarios, encargados de reparar biomoléculas dañadas por los radicales libres: **proteasas reparadoras del DNA** y **metionina sulfóxido reductasa** (Cabrera & Serrano, 2014).

## 1.6 Estrés oxidativo

El **estrés oxidativo**, es consecuencia de la exposición de la materia viva a los radicales libres y especies reactivas dependientes de oxígeno (EROS), generadas como subproductos del metabolismo aerobio y cuya producción aumenta ante cualquier lesión tisular. Esta situación puede ser consecuencia bien de una sobreexposición a los radicales libres o bien a causa de un déficit de las defensas antioxidantes produciendo una ruptura del equilibrio que debe existir entre ambos (Halliwell & Gutteridge, 1984).

El resultado, es una grave alteración de la relación estructura-función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado del organismo; lo que explica su implicación en la etiopatogenia de numerosas enfermedades (Ames et al., 1993) y en procesos de deterioro como el envejecimiento.

## Implicaciones fisiológicas

### Envejecimiento

El envejecimiento fisiológico es un proceso natural, complejo e irreversible que tiene lugar a lo largo de la vida de un individuo y se acompaña de un deterioro progresivo de la función celular (Crespo et al., 1997). Existen dos grupos de teorías que tratan de explicarlo: las **deterministas** sostienen que estas alteraciones están programadas genéticamente y las **estocásticas** postulan que son consecuencia de la acumulación de daños en moléculas vitales provocados por factores ambientales.

Dentro de estas últimas está la teoría de los radicales libres. Se basa en el hecho de que, aún en condiciones ideales, aproximadamente el 1-3% del O<sub>2</sub> se convierte en superóxido en la mitocondria, causando graves daños sobre el DNA de este orgánulo (Cadenas & Davies, 2000). Puesto que esta molécula no tiene mecanismos de reparación, los defectos se acumulan, dando lugar a mitocondrias cada vez menos eficientes. Parece ser también fundamental en este deterioro la **oxidación** de las proteínas, cuyo aumento **reduce progresivamente la funcionalidad y estabilidad de las enzimas** (Stadtman, 2004) y la alteración del **ratio de los ácidos grasos saturados/insaturados** (García et al., 2010).

### Ejercicio

La actividad física aumenta las necesidades metabólicas del organismo y el consumo de O<sub>2</sub> en la mitocondria hasta 25 veces respecto al estado de reposo. El correspondiente incremento de la

peroxidación lipídica de las membranas celulares fue demostrado por primera vez por Dillard et al. (1978).

Este hecho, podría parecer contradictorio pues está ampliamente comprobado que el ejercicio físico es un componente vital en el mantenimiento de la salud y, sin embargo, aumenta la concentración de ROS. Artículos recientes argumentan que, cuando se practica regularmente, dicha elevación potencia las defensas antioxidantes desembocando en una mayor tolerancia al estrés oxidativo (Gago-Dominguez et al., 2007; Kaczor et al., 2007). Radak et al. incluso descubrieron que el ejercicio regular prevenía la disminución del cociente GSH/GSSG asociado a la edad (2004). Esta es la denominada **respuesta adaptativa**.

Numerosos son los artículos que parecen corroborar esta teoría. En el estudio llevado a cabo por Leonardo-Mendoza et al. (2014), se dividieron 10 ciclistas profesionales en dos grupos: control y con suplementos de vitamina C. A pesar de que la actividad antioxidante total de estos últimos era mayor durante el ejercicio, al final, los niveles convergían. Ello sugiere que los atletas bien entrenados no requieren suplementos antioxidantes porque sus defensas endógenas ya están adaptadas a los ROS producidos por la actividad física.

## Patología

El estrés oxidativo está presente en la mayor parte de las patologías conocidas. Como ejemplos de ello, se puede citar la cardiopatía isquémica y el infarto agudo de miocardio. En estas situaciones, el exceso de radicales libres no solo afecta a los miocitos, sino que inicia el proceso aterosclerótico por daño en la pared vascular, provocando la penetración al espacio subendotelial de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Por ello, los bajos niveles de antioxidantes y la peroxidación lipídica están involucrados en las fases tempranas del proceso aterosclerótico (Cabrera & Serrano, 2014).

También es importante destacar su importancia en la isquemia/reperfusión. Una forma de inflamación donde la formación masiva de oxidantes durante el restablecimiento del flujo sanguíneo puede agravar el daño tisular producido por la falta de O<sub>2</sub> (Kleikers et al., 2012).

La sobreproducción de ROS se ha propuesto como una de las principales causas de las complicaciones en pacientes con diabetes tipo II. Esto es debido a que la hiperglucemia estimula su formación a partir de una gran variedad de fuentes (fosforilación oxidativa, auto-oxidación de la glucosa, etc) (Molnár et al., 2015).

Numerosos estudios han demostrado que existe también una relación entre el desequilibrio redox y la estimulación oncogénica. La toxicidad acumulada de los ROS en lípidos, proteínas y sobre todo en el DNA lleva a una modificación genética permanente implicada en la mutagénesis y carcinogénesis (Miyanishi et al., 2015).

Por último, es especialmente relevante en patologías como el Alzheimer (en el que parecen intervenir el hierro y cobre como potenciadores de la reacción de Fenton) o el Parkinson (en el que los radicales libres median la destrucción de la sustancia nigra) ya que el cerebro es muy susceptible al estrés oxidativo (Valko et al., 2007).

## 1.7 Modelos de estrés oxidativo

Todas estas condiciones patológicas han sido estudiadas en profundidad tanto *in vivo* como *in vitro*. Los primeros incluyen los modelos transgénicos animales de determinadas enfermedades como

el Alzheimer (Matsumura et al., 2015), sobre los que se estudia la exposición a tóxicos (Bijarnia et al., 2015) o el daño quirúrgico, especialmente en los casos de isquemia por reperusión (Zhu et al., 2007).

Se ha demostrado que los metales de transición, particularmente el hierro, contribuyen en gran cantidad de enfermedades por medio de la reacción de Fenton. Así pues, se ha desarrollado un modelo *in vitro* ampliamente aceptado, que produce radicales por esta vía usando  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico (Gutteridge, 1984; Cadenas et al., 1989; Millán-Plano et al., 2010; Puukila et al., 2015).

Dentro del campo de la investigación clínica, uno de los principales objetivos es la búsqueda de tratamientos que frenen la progresión de los daños debidos a la acción de los ROS. Para ello, se realizan estudios en los que se aplica un tratamiento potencialmente antioxidante a un modelo de estrés oxidativo. La obtención de resultados viables y útiles requiere una gran cantidad de experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*, con el consiguiente coste, no solo económico, sino también en animales de laboratorio. Para minimizar tanto los gastos como el empleo animal, se propone generar un modelo numérico capaz de predecir el comportamiento de un antioxidante cualquiera en un modelo *in vitro* de estrés oxidativo.

La anticipación de estos resultados se hace gracias a una superficie de respuesta que se nutre de información experimental para su creación. Sin embargo, una vez construida, permitiría interpolar cualquier muestra o nuevo parámetro, sin necesidad de pruebas empíricas.



## 2. Objetivos

---

### 2.1 Objetivos del grupo de investigación

El presente trabajo de fin de grado (TFG) se ha realizado bajo la tutela de Javier Miana, Jorge Grasa y David González, profesores pertenecientes al **grupo de Mecánica Aplicada y Bioingeniería** (Applied Mechanics and Bioengineering - **AMB**). Dicho grupo integra profesores del departamento de Ingeniería Mecánica de la Escuela de Ingeniería y Arquitectura (EINA) y el departamento Farmacología y Fisiología de la Universidad de Zaragoza. Entre las actuales líneas de trabajo cabe destacar la caracterización experimental de materiales, la modelización del ojo humano, el estudio de la electrofisiología del corazón y la simulación numérica de diferentes procesos biológicos. Este TFG se enmarca precisamente en esta última línea, en la que la colaboración entre los biotecnólogos y veterinarios con los ingenieros es fundamental.

### 2.2 Objetivo general

El objetivo último de la investigación es construir, gracias a los datos obtenidos en este TFG, un modelo numérico único en el que poder predecir cómo se comportará un órgano sometido a estrés oxidativo *in vitro* cuando está protegido por un antioxidante. Esta herramienta minimizará la parte experimental ya que bastará con conocer la composición del tejido y el poder antioxidante del tratamiento a ensayar. Con estos datos, la superficie de respuesta calculada será capaz de anticipar el daño que sufriría el tejido si fuera expuesto a un amplio espectro de condiciones (concentración/tiempo) en un modelo de estrés oxidativo *in vitro*.

### 2.3 Objetivos específicos

Para alcanzar el objetivo general, es decir, el desarrollo de un modelo matemático predictivo de estrés oxidativo, ha sido necesario alcanzar los siguientes objetivos específicos:

1. Puesta a punto del modelo oxidativo *in vitro*. Determinación de las concentraciones de  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico, así como de los tiempos de incubación óptimos para inducir una diferencia significativa en la oxidación lipídica de los distintos tejidos.
2. Obtención de datos. Medición del grado de peroxidación lipídica *in vitro* de los distintos órganos perfundidos y sometidos a los diferentes tiempos de incubación y concentraciones de  $\text{FeCl}_3$ , fijados en el punto 1.
3. Puesta a punto del método de medida de la actividad antioxidante de los tejidos sometidos a estrés oxidativo (en cerebro, músculo esquelético, riñón, corazón e hígado).
4. De manera más transversal, otro de los objetivos fue que la habituación al modo de trabajo en un laboratorio, así como al método científico (diseño experimental, obtención de resultados, análisis de los mismos y su discusión).

## 3. Materiales y métodos

---

### 3.1 Dispositivo experimental

Las pruebas experimentales se realizaron en 10 conejos machos blancos de Nueva Zelanda administrados por SAEA (Servicio de Apoyo a la Experimentación Animal), de conformidad con lo dispuesto en el Consejo Europeo (ETS 123) y la Unión Europea (Directiva 86/609/CEE) en materia de protección de animales utilizados para fines científicos experimentales y otros (nº comité ético: PI26/15). Solo se emplearon machos para evitar cualquier distorsión causada por la diferencia hormonal en los distintos sexos.

El peso corporal de los conejos era  $2.375 \pm 50$  g. La temperatura ambiente del animalario fue de  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  y se mantuvo un ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas. Los animales fueron sacrificados por una inyección intravenosa de pentobarbital sódico (300 mg/kg). Inmediatamente después, se extrajeron los tejidos requeridos. Para evitar la influencia del ritmo circadiano, todas estas extracciones se realizaron aproximadamente a la misma hora de la mañana.

#### Perfusión y obtención tisular

En el momento de recogida de las muestras, se llevó a cabo una perfusión *in vivo* del lecho vascular con suero fisiológico a  $4^\circ\text{C}$ . Para facilitar el drenaje del sistema venoso se hizo una incisión en la aurícula derecha del corazón, lo que constituye una rápida vía de salida de la sangre; que es sustituida por el suero.

De cada animal se extrajeron: hígado, riñón, corazón, músculo y cerebro. Se trocearon con un bisturí sobre una placa de Petri y se pesaron 0,5g. Para disminuir la variabilidad se homogeneizaron con un potter manual (añadiendo 4mL de TRIS por cada 0,5g de tejido) de vidrio (en hielo).

Todo este proceso se realizó en frío para reducir al máximo posible la degradación enzimática tisular. Posteriormente, las muestras se distribuyeron en alícuotas de 500µl y se almacenaron a  $-80^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser utilizadas en los ensayos.

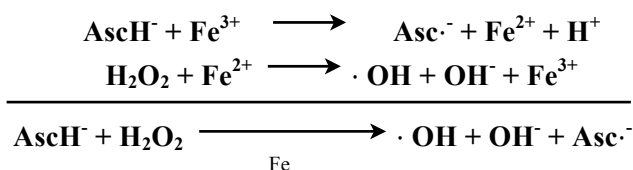
### 3.2 Oxidación *in vitro*

Para simular las condiciones de estrés a las que puede estar sometido un organismo se llevó a cabo la oxidación *in vitro* de los homogeneizados. Para ello, se utilizó un sistema generador de radicales hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ) basado en la reacción de Fenton.

El estado redox está ligado a los iones de Fe y Cu cuyos límites están estrictamente regulados en el organismo. De hecho, durante su metabolismo están siempre unidos a proteínas para evitar que las formas libres catalicen reacciones de oxido-reducción y destruyan las estructuras intracelulares. Sin embargo, el exceso de superóxido es capaz de oxidar el  $\text{Fe}^{3+}$  (insoluble), liberando  $\text{Fe}^{2+}$ . El ión férrico puede entonces participar en la **reacción de Fenton** y **Haber-Weiss** generando el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ , muy reactivo; con una vida media de  $10^{-9}$ s) (Pastor et al., 2000). Además, dado que el metal no se consume en el proceso, una sola molécula puede dar lugar a un ciclo de producción continua.

El Fe necesario para esta reacción puede provenir de las enzimas con grupos [4Fe-4S].

El ión férrico puede ser reducido por el ácido ascórbico, el cual se oxida a ascorbilo (Rowley & Halliwell, 1983). Este fue el sistema utilizado y su mecanismo es el siguiente (Levine et al., 2011):



Al recrear este proceso en el laboratorio, el ácido ascórbico (a concentración constante, 0.1 mM en TRIS) es el agente reductor mientras que el metal de transición se obtiene a partir del  $\text{FeCl}_3$  (a 0.1, 0.5, 1, 5 y 8 mM en TRIS). Los homogeneizados se incubaron con estas disoluciones a 37°C durante 10, 30, 60 y 90 minutos tras lo cual, la reacción se detuvo por adición de EDTA 2 mM en TRIS (quelante de iones divalentes como el  $\text{Fe}^{2+}$ ) en frío. Para cada tejido, tiempo de incubación y concentración de  $\text{FeCl}_3$  se realizaron cinco réplicas.

### 3.3 Determinación del daño oxidativo

Con el objetivo de cuantificar el efecto de los radicales libres, se caracterizó la peroxidación lipídica de los tejidos midiendo la concentración de malonildialdehído y 4-hidroxiálquenos (MDA+4-HDA) en homogeneizados de los órganos extraídos.

La acción de los ROS sobre los lípidos tiene lugar fundamentalmente sobre los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas celulares. Como resultado, se obtienen aldehídos, gases hidrocarbonados y varios residuos químicos, siendo mayoritarios el MDA y los 4-HDA. Así pues, la concentración de estas sustancias es proporcional a la peroxidación y, por tanto, un indicador del grado en el que esta se ha producido.

Para llevar a cabo dicha determinación, se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción del reactivo cromógeno N-metil-2-fenilindol, con el MDA o con los 4-HDA a una temperatura de 45°C. La condensación de una molécula de MDA con dos moléculas de N-metil-2-fenilindol produce un cromóforo estable que, en presencia del ácido metanosulfónico presenta una absorbancia máxima a 586 nm (Figura 3). Cada medida se realizó por duplicado.

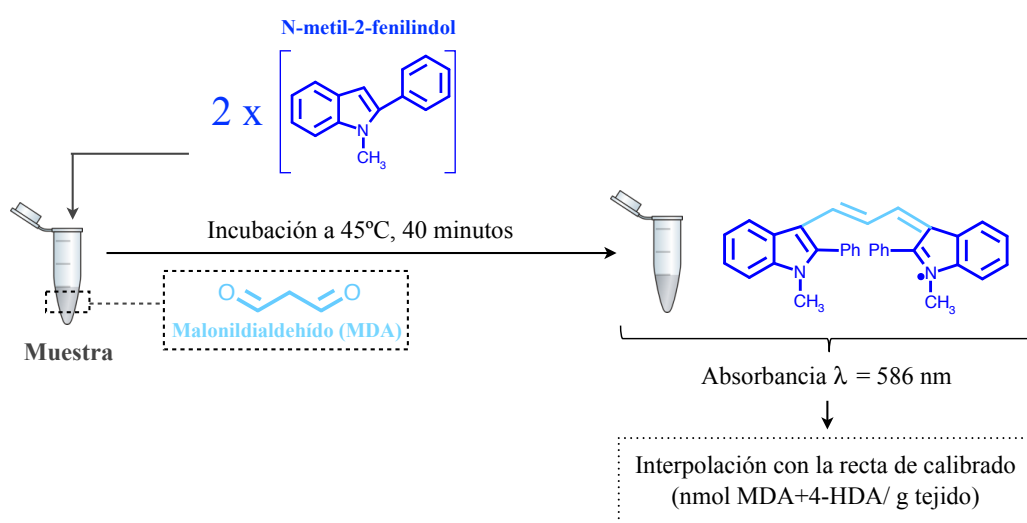


Figura 3. Técnica utilizada para la determinación de MDA+4-HDA en la peroxidación lipídica.

### 3.4 Determinación de la actividad antioxidante total

Para determinar la actividad antioxidante total de la muestra, se realizó un ensayo basado en la inhibición de la absorbancia del radical catiónico 3-etilbenzotiazolino 6-sulfonato (**ABTS**) el cual posee un máximo de absorción característico a una longitud de onda de 660, 734 y 820 nm (Re et al., 1999).

Para realizar el procedimiento, el ABTS se disuelve en agua destilada hasta una concentración de 7mM. El radical catiónico se produce por reacción de este compuesto con una disolución de persulfato de potasio con concentración final de 2.45 mM (que debe permanecer a temperatura ambiente y en condiciones de oscuridad 12-16h antes de su uso).

El  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  fue disuelto con PBS (tampón fosfato; pH= 7.4) hasta una absorbancia de 0.7 ( $\pm 0.02$ ) a 734 nm y equilibrado a 30°C. Después, se disponen 2 ml del  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  disuelto y 20  $\mu\text{l}$  de muestra o control. Esta mezcla se incubó durante 6 minutos a 30°C e inmediatamente después se lee su absorbancia.

El porcentaje de inhibición de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  con respecto a la muestra fue calculado de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left( \frac{A_{C(0)} - A_{A(t)}}{A_{C(0)}} \right) \times 100$$

Los resultados fueron expresados en % de inhibición. (Katalinic et al., 2005). Para cada muestra se realizaron tres réplicas.

### 3.5 Estadística

Las variables cuantitativas se definieron mediante dos parámetros, la media aritmética, como medida de la tendencia central, y el error estándar, como una medida de dispersión. El valor de significación estadística se estableció en  $p \leq 0,05$ .

Los datos fueron tratados estadísticamente. En primer lugar, se comprobó la normalidad de los mismos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Después, se realizó un análisis de varianza (ANOVA multifactorial) y las comparaciones entre grupos se hicieron mediante un test Scheffé. Para comprobar la correlación entre variables se utilizó el test de Pearson.

### 3.6 Composición tisular

El porcentaje del contenido en grasa de los tejidos fue determinado por un servicio externo de la Facultad de Veterinaria, siguiendo la metodología oficial descrita en el BOE del 29 de agosto de 1979 ("Orden 21118, BOE núm. 207," 29 de agosto de 1979). Para cada tejido se realizaron tres réplicas. Los resultados aparecen expresados en porcentaje sobre materia fresca.

## 4. Resultados y discusión

### 4.1. Actividad antioxidante y composición tisular

Con el modelo matemático de predicción se pretende elaborar una ecuación única con la que poder interpolar el grado de oxidación de cualquier tejido sin necesidad de llevar a cabo el proceso experimental. Por este motivo, los órganos deben estar caracterizados por los dos parámetros que más influyen en el grado de peroxidación lipídica: su porcentaje en grasa y su actividad antioxidante (Figura 4).

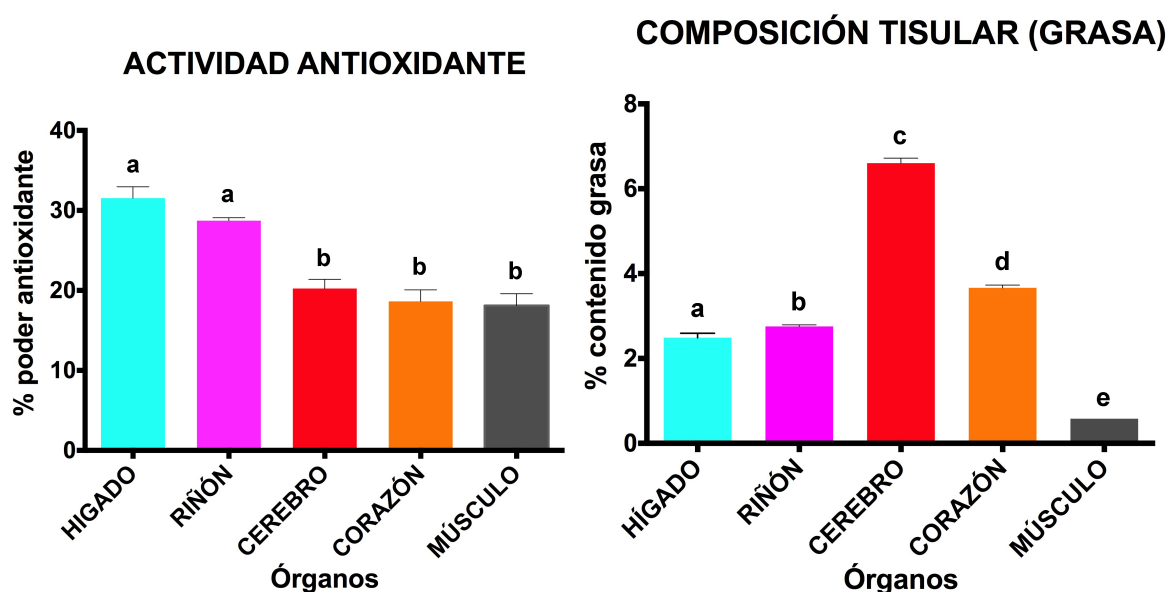


Figura 4. Composición del hígado, riñón, cerebro, corazón y músculo en cuanto a su poder antioxidante (izquierda) y a su contenido en grasa (derecha), representado junto con la desviación estándar correspondiente.

El análisis estadístico demostró que tanto el hígado como el riñón muestran unos niveles de actividad antioxidante significativamente superiores al resto de tejidos ( $p < 0,05$ ). Esto no resulta sorprendente ya que son órganos encargados de la detoxificación de sustancias del organismo, proceso que comprende reacciones de oxidación, reducción, hidrólisis, conjugaciones con metabolitos celulares, etc. cuya finalidad es la formación de productos inocuos o de fácil excreción. En cuanto al resto de los tejidos, las diferencias entre cerebro, corazón y músculo no son significativas.

El porcentaje de grasa se midió sobre materia fresca. Destaca la gran cantidad presente en el cerebro, con un 6,6% de grasa. En el otro extremo aparece el músculo esquelético, con tan solo un 0,58%. Hay que destacar que aunque las diferencias entre el contenido en grasa de los diferentes tejidos es aparentemente pequeña, se detectaron diferencias significativas entre todos ellos ( $p < 0,05$ ) dada la poca variabilidad que aparece en las réplicas de las medidas.

### 4.2. Oxidación de tejidos *in vitro*

Los niveles de MDA+4-HDA se determinaron manteniendo la temperatura de incubación constante a 37°C y modificando el tiempo de incubación: 10, 30, 60 y 90 minutos en hígado, riñón, corazón, músculo y cerebro. El resumen de los resultados aparece recogidos en la Tabla 1 (Anexo 2) y muestra que conforme aumenta el periodo de tiempo de la oxidación *in vitro*, también lo hacen de

forma significativa los indicadores bioquímicos de peroxidación lipídica. El análisis estadístico correspondiente se adjunta en los anexos.

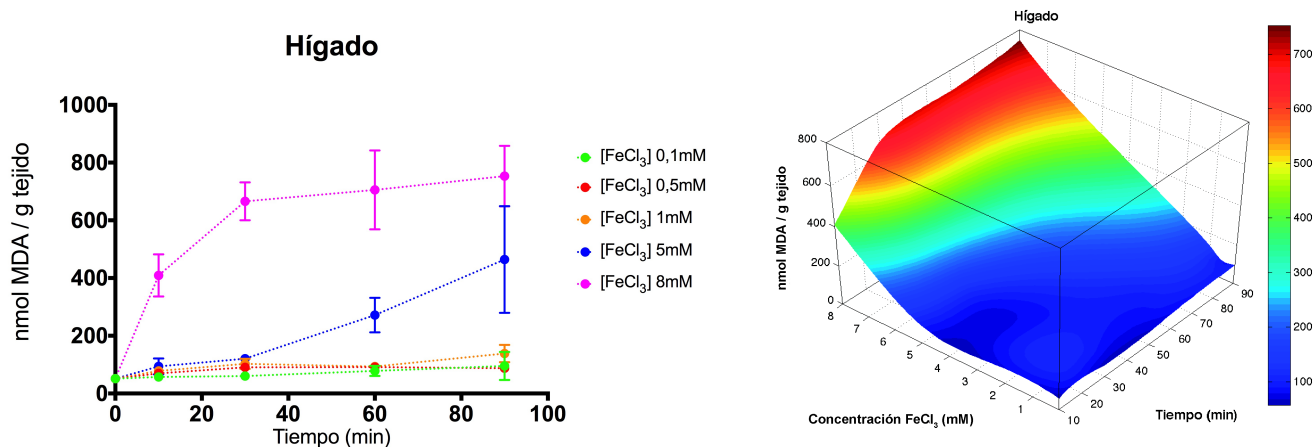
## Hígado

Los resultados (Figura 5) muestran que a concentraciones bajas de  $\text{FeCl}_3$  (0,1; 0,5 y 1 mM) el comportamiento es similar a lo largo del tiempo, sin mostrar diferencias significativas entre ellos ni con el control ( $p>0,05$ ). Al aumentar la concentración a 5 mM se observa como el patrón cambia y a partir de los 60 minutos la cantidad de MDA+4-HDA es mucho mayor que la del resto de las concentraciones descritas ( $p<0,05$ ).

Analizando los datos obtenidos, al someter la muestra a una concentración todavía más elevada (8mM), el valor de MDA+4-HDA se dispara desde el primer tiempo (10 minutos), estableciéndose una diferencia estadísticamente significativa con el resto de concentraciones en todos los momentos. La peroxidación lipídica comienza muy rápidamente por el alto número de  $\cdot\text{OH}$  presente. No obstante, a partir del minuto 30 hasta el final, los valores se estabilizan ( $p>0,05$ ). Como consecuencia, la curva adquiere la forma de una hipérbola rectangular. Ello podría deberse al agotamiento del sustrato (en algún momento entre los 10 y 30 minutos).

El valor máximo de MDA+4-HDA fue de  $753,24 \text{ nmol/g} \pm 105,09$ , alcanzado a los 90 minutos con una concentración de  $\text{FeCl}_3$  8 mM.

En una primera aproximación para construir el modelo numérico final, los datos fueron representados en una superficie en tres dimensiones, en la cual se podría interpolar la cantidad de oxidación del hígado a distintas concentraciones de  $\text{FeCl}_3$  y tiempos de incubación (Figura 5).



**Figura 5. Representación de la media y la desviación típica de las 5 repeticiones llevadas a cabo para cada tiempo (10, 30, 60 y 90 minutos) y concentración de  $\text{FeCl}_3$  [0,1], [0,5], [1], [5] y [8] mM del homogeneizado de hígado (izquierda). Superficie de predicción en tres dimensiones, aplicada únicamente a los datos del hígado (derecha).**

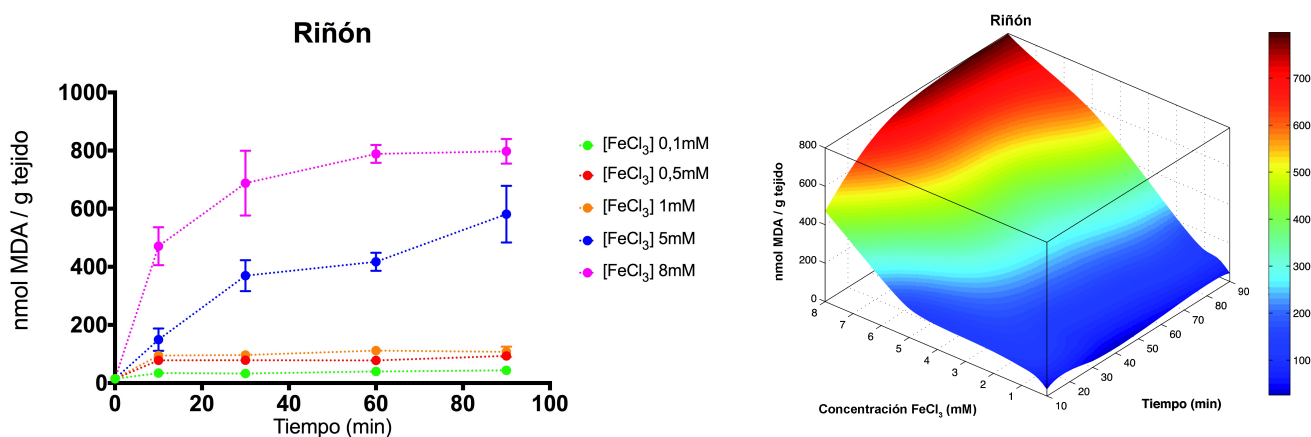
Tal y como puede apreciarse en la figura 4, el hígado es el órgano que más poder antioxidante posee. Esto es debido a que, como consecuencia de su función fisiológica, también es el que más radicales libres fabrica y debe protegerse ante su propio metabolismo. Cabe destacar la importancia de los citocromos (especialmente el  $\text{P}_{450}$ ) en la detoxificación desempeñada por este órgano ya que representan una importante fuente de radicales libres de oxígeno endógenos. Situaciones que producen un déficit en su defensa antioxidante como el alcoholismo, pueden dar lugar a procesos fibrogénicos y desembocar en **cirrosis** (Muriel, 2009).

## Riñón

A bajas concentraciones de  $\text{FeCl}_3$ , los niveles de oxidación son muy bajos, aunque muestran diferencias significativas con el control desde los 10 minutos de incubación (Figura 6). No obstante, a partir de este momento, los niveles se mantienen estables para las concentraciones de  $\text{FeCl}_3$  de 0,1, 0,5 y 1 mM a pesar de mantener la incubación hasta los 90 minutos.

En las concentraciones más elevadas el comportamiento es diferente. Al someter el riñón a  $\text{FeCl}_3$  5 mM, la oxidación aumenta más rápido que en el caso del hígado, de manera que a los 30 minutos ya hay diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a las anteriores concentraciones.

Por último, a 8 mM, la curva vuelve a adoptar la misma forma que en el hígado (siendo  $p < 0,05$  desde los 10 minutos), de hecho, no hay diferencias significativas entre ambos tejidos tras 90 minutos de incubación a esta concentración:  $797,29 \text{ nmol/g} \pm 42,41$  en riñón vs  $753,24 \text{ nmol/g} \pm 105,08$  en hígado. La estabilización de los valores, junto al hecho de alcanzar prácticamente la misma concentración de MDA+4-HDA que en el hígado (órgano cuya composición es tan similar,  $p < 0,05$ ) refuerza la teoría de que en este punto se produce el agotamiento del sustrato.



**Figura 6.** Representación de la media y la desviación típica de las 5 repeticiones llevadas a cabo para cada tiempo (10, 30, 60 y 90 minutos) y concentración de  $\text{FeCl}_3$  [0,1], [0,5], [1], [5] y [8] mM del homogeneizado de riñón (izquierda). Superficie de predicción en tres dimensiones, aplicada únicamente a los datos del riñón (derecha).

En definitiva, aplicando el modelo de estrés oxidativo *in vitro* al riñón, se aprecia una clara similitud con el comportamiento del hígado. Ello podría estar justificado por el contenido tan parecido en grasa que poseen ambos tejidos, así como por la actividad antioxidante similar que muestran ( $p > 0,05$ ).

En el caso concreto del riñón, el modelo predictivo que se desea desarrollar podría aplicarse en el estudio de enfermedades como la nefropatía diabética, todavía la primera causa de enfermedad renal terminal. Actualmente, los fármacos empleados tienen como diana el eje renina-angiotensina-aldosterona pero hay evidencias experimentales de que el estrés oxidativo y su relación con la inflamación del riñón están implicadas en el deterioro del órgano. La administración de metil bardoxolone (antioxidante sintético) mejora la función en pacientes en estadios avanzados (Rojas-Rivera et al., 2012). El modelo terminado, podría ayudar a estimar la dosis adecuada.



## Corazón

El análisis estadístico muestra que, al igual que en los casos anteriores, entre las concentraciones de 0,1; 0,5 y 1 mM no hay diferencias apreciables ( $p>0,05$ ). Sin embargo, sí las hay a 5 mM a 10 minutos con respecto al control y a las concentraciones anteriores. En tiempos de incubación superiores (30, 60 y 90 minutos), la oxidación se estabiliza. Esto podría corresponder con un nivel de oxidación ante el cual el tejido es capaz de reaccionar, pudiendo controlar los radicales de oxígeno generados para evitar el daño celular (Figura 7).

Por último, con una concentración de  $\text{FeCl}_3$  de 8 mM, todos los puntos presentan una diferencia estadísticamente significativa tanto entre ellos como con respecto al resto de las concentraciones ( $p<0,05$ ). En contraposición con lo que ocurre en hígado y riñón, la peroxidación no parece haber acabado por falta de sustrato, ya que la curva sigue presentando una tendencia ascendente. Para comprobar esta hipótesis, deberían realizarse más experimentos ya sea con concentraciones superiores de hierro o aumentando el tiempo de incubación.

Cabe señalar que el máximo valor alcanzado es mayor que en los anteriores ( $p<0,05$ ):  $1002,57 \text{ nmol/g} \pm 72,08$  a 90 minutos y 8 mM. Esto queda justificado por la presencia de 1,47 y 1,33 veces más de tejido adiposo en el corazón que en el hígado y riñón respectivamente, sumado al hecho de que además posee una actividad antioxidante inferior a ambos tejidos ( $p<0,05$ ).

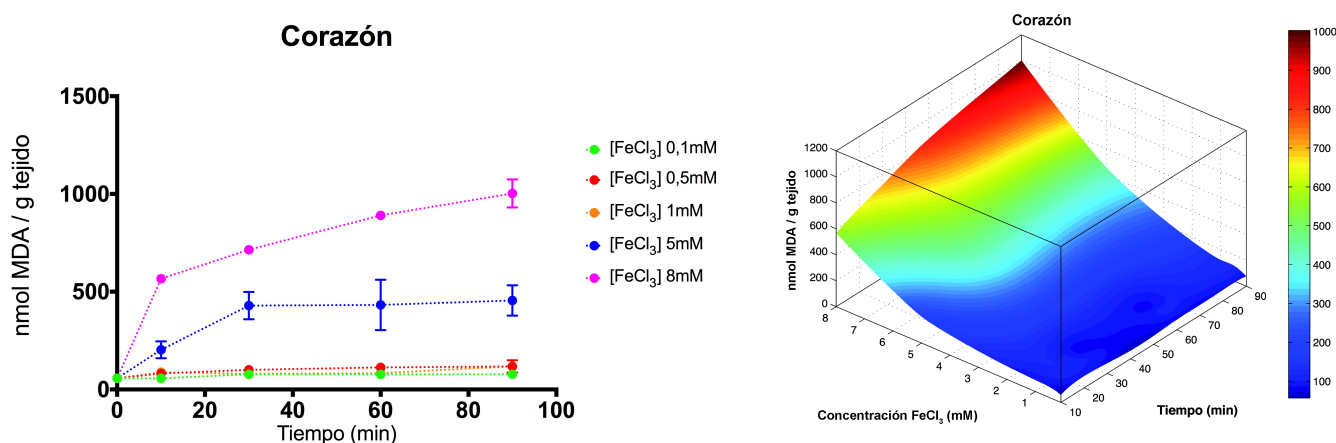


Figura 7. Representación de la media y la desviación típica de las 5 repeticiones llevadas a cabo para cada tiempo (10, 30, 60 y 90 minutos) y concentración de  $\text{FeCl}_3$  [0,1], [0,5], [1], [5] y [8] mM del homogeneizado de corazón (izquierda). Superficie de predicción en tres dimensiones, aplicada únicamente a los datos del corazón (derecha).

Existen evidencias que muestran que el estrés oxidativo repercute en la función del órgano. Su aumento tanto a nivel sistémico como miocárdico ha sido demostrado durante la insuficiencia cardíaca (Madamanchi & Runge, 2013).

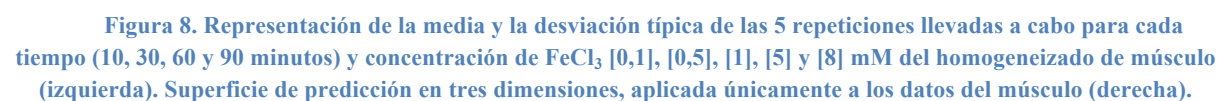
## Músculo

El comportamiento del músculo ante el modelo de oxidación *in vitro* con una concentración de  $\text{FeCl}_3$  de 0,1 mM describe una curva en la que el control y la incubación a los 10 minutos no presentan una diferencia estadísticamente significativa, aunque sí la hay con respecto a los valores para 30 y 60 minutos ( $p<0,05$ ). Además, aparece una elevación final muy acusada a los 90 minutos (Figura 8).

A 0,5 y 1 mM, sin embargo, la concentración de MDA+4-HDA se estabiliza a 10, 30 y 60 minutos, presentando diferencia con respecto al control y al valor de 90 minutos.



Para finalizar, se somete el homogeneizado a una concentración de  $\text{FeCl}_3$  de 8 mM, algo muy improbable en condiciones naturales. Entonces aparece la ya conocida forma de hipérbola rectangular (presente también en hígado y riñón), en la que a los 10 minutos ya hay una gran oxidación con respecto al control y al resto de concentraciones, que sigue aumentando ( $p < 0,05$ ) hasta mantenerse prácticamente constante a 30, 60 y 90 minutos.



Se trata de un tejido capaz de obtener ATP de varias fuentes energéticas para llevar a cabo su contracción. Dependiendo de la cantidad y la rapidez de la demanda, utiliza una u otra vía metabólica. Cuando se requiere energía de forma rápida, se emplea la vía anaerobia; mientras que para ejercicios de ligera o moderada intensidad o de larga duración la vía aeróbica es la predominante, es decir, el metabolismo de los hidratos de carbono y grasas con la participación del O<sub>2</sub> en las mitocondrias. Debido a la constante producción de ROS parece evidente que este tejido debería tener una mayor concentración de antioxidantes.

23

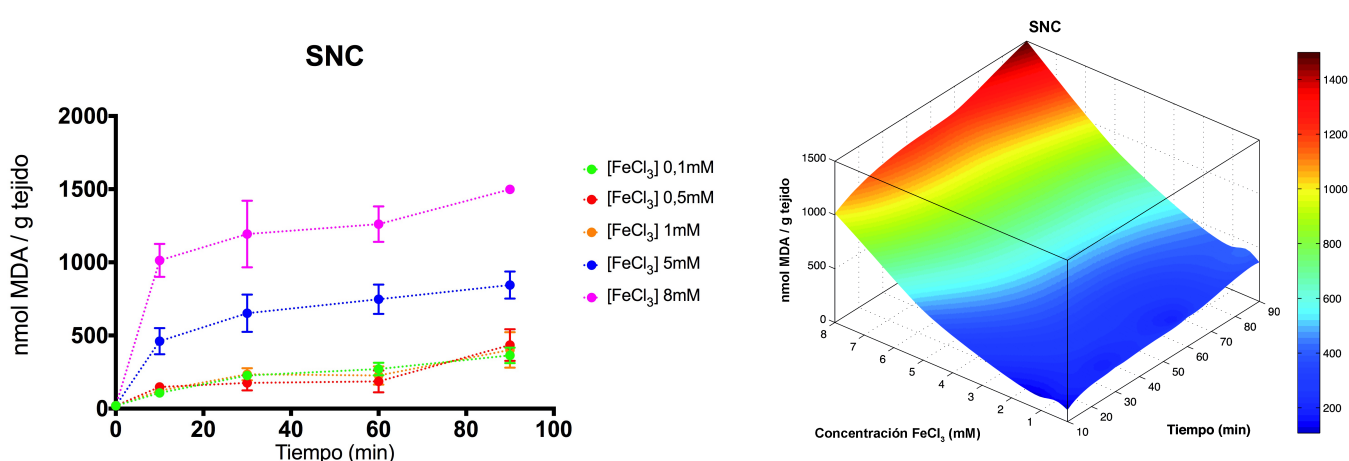
Los resultados del corazón y el músculo ponen de manifiesto el comportamiento tan diferente que existe entre estos dos tejidos, aún siendo aparentemente semejantes. La principal causa de dicho cambio podría ser el contenido en grasa de los mismos. El hecho de que el corazón tenga 6,31 veces más de tejido adiposo que el músculo esquelético (con un valor similar de actividad antioxidante,  $p > 0,05$ ), podría justificar que el valor máximo de oxidación es prácticamente el doble a 8 mM y 90 minutos:  $1002,57 \text{ nmol/g} \pm 72,08$  (corazón) frente a  $508,74 \text{ nmol/g} \pm 51,85$ .

Desde el punto de vista biológico, el músculo cardíaco se diferencia del esquelético en diversos aspectos, en lo referente al estado oxidativo, hay que destacar que contiene un mayor número de mitocondrias que, además, son más grandes. También posee una cantidad de mioglobina más elevada, que le permite suministrar las grandes cantidades de  $O_2$  que requiere para su contracción.

## Cerebro

Cabe señalar en este tejido que incluso a la menor de las concentraciones de  $FeCl_3$  (0,1 mM) se detectaron niveles significativos de daño oxidativo a los 10 minutos de incubación. A los 30 y 60 minutos se mantiene constante y vuelve a ascender de manera significativa a los 90 minutos. El comportamiento de 0,5 y 1 mM es similar a la concentración descrita, de manera que se pueden agrupar los resultados obtenidos para estas concentraciones y decir que el daño oxidativo aparece muy rápidamente y que los valores son estables hasta los 60 minutos para finalmente subir de manera significativa.

Como puede apreciarse en la figura 9, los valores de MDA+4-HDA detectados cuando se somete la muestra a concentraciones de  $FeCl_3$  5 mM son significativamente superiores a las concentraciones anteriores en todo momento ( $p < 0,05$ ). Cuando se incubó el tejido neuronal a  $[FeCl_3]$  de 8 mM el daño oxidativo detectado fue prácticamente el doble en cada punto de control si se compara con los datos de 5 mM. Destaca el elevado valor alcanzado a los 90 minutos y 8 mM:  $1498,72 \text{ nmol/g} \pm 25,71$ , el mayor de todos los órganos.



**Figura 9. Representación de la media y la desviación típica de las 5 repeticiones llevadas a cabo para cada tiempo (10, 30, 60 y 90 minutos) y concentración de  $FeCl_3$  [0,1], [0,5], [1], [5] y [8] mM del homogeneizado de SNC (izquierda). Superficie de predicción en tres dimensiones, aplicada únicamente a los datos del cerebro (derecha).**

El sistema nervioso es particularmente vulnerable al deterioro producido por los ROS porque contiene una elevada concentración de ácidos grasos poliinsaturados que son muy susceptibles a la peroxidación (LPO). De hecho, la grasa tisular es el componente predominante del cerebro (el contenido total puede alcanzar la mitad del peso seco) localizándose especialmente en los axones

nerviosos, ya que las vainas de mielina están formadas por capas coaxiales de proteínas y lípidos. Esto se aprecia en la figura 4, en la que el cerebro es el órgano con mayor contenido en grasa de todos los tejidos examinados ( $p < 0,05$ ).

Además, comparado con otros tejidos, el cerebro usa una gran cantidad de oxígeno para producir energía y es pobre en enzimas antioxidantes (las cuales disminuyen con la edad) (Andre et al., 2006). Esto se ve reflejado en la figura 4, donde las defensas frente al estrés oxidativo (20,24%) son menos de la mitad de las del hígado.

Por ello, no es de extrañar que en este órgano se den los valores más elevados de MDA+4-HDA. Al comparar la máxima oxidación del cerebro ( $1498,72 \text{ nmol/g} \pm 25,71$ ) con la del músculo ( $508,74 \text{ nmol/g} \pm 51,85$ ), queda demostrado que ambos representan extremos opuestos en el comportamiento oxidativo. A pesar de tener un porcentaje de antioxidantes muy similar llega hasta una oxidación 2,7 veces más elevada debido a su gran contenido lipídico.

Para hacerse una idea de la gran susceptibilidad de este órgano al estrés oxidativo, a todo lo anterior hay que añadir que el cerebro acumula ascorbato, hierro y aluminio en regiones concretas (Miller et al., 2014). El depósito de este último elemento, ha sido asociado con la etiología de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson o el Alzheimer por aumentar el poder oxidante del Fe por medio de un mecanismo todavía desconocido (Albendea et al., 2007).

### **Estrés oxidativo y características intrínsecas del tejido**

Una vez obtenidos todos los resultados, se estudió la correlación existente entre las siguientes tres variables: contenido en grasa, nivel de actividad antioxidante y daño oxidativo tras la incubación. Tal y como se ha visto a lo largo del trabajo, la peroxidación lipídica a los 90 minutos parece ser mayor cuanto mayor es el contenido en grasa del tejido.

Aplicando el test de Pearson (Anexo 3, tabla 70) se pudo confirmar que efectivamente existe una correlación significativa entre el contenido lipídico y el daño tras 90 minutos de incubación a cualquiera de las concentraciones de cloruro de hierro. Esta correlación es mayor cuanto mayor es la concentración de  $\text{FeCl}_3$  ( $p < 0,001$  para 5 mM y 8 mM), alcanzando valores de  $R^2 = 0,981$  a  $[\text{FeCl}_3] 8 \text{ mM}$ . Este dato parece indicar que el daño oxidativo producido en esas condiciones es casi únicamente dependiente del contenido de grasa tisular.

Por otra parte, el daño oxidativo presenta una correlación significativa ( $p < 0,05$ ) con la actividad antioxidante del tejido solamente a concentraciones relativamente bajas de  $\text{FeCl}_3$ . Cuando son iguales o superiores a 5 mM deja de haber correlación entre ambas variables.

En los dos casos, los datos sugieren que este grado de estrés oxidativo no puede ser controlado por las defensas antioxidantes del tejido. De ello se deduce que probablemente sea un nivel de estrés oxidativo que supera al fisiológico.

## 5. Conclusiones

---

Tras el análisis de los resultados y su discusión, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

### Relacionado con la puesta a punto del modelo de oxidación *in vitro*

1. El tiempo de incubación por debajo de 10 o por encima de 90 minutos no aporta información extra para el modelo matemático a desarrollar.
2. Concentraciones de  $\text{FeCl}_3$  inferiores a 0,1 mM o superiores a 8 mM no aportan datos útiles para optimizar el futuro modelo de predicción. Las concentraciones de ácido ascórbico deben mantenerse constantes y relativamente bajas para evitar su acción antioxidante.

### Relacionado con el contenido de grasa y actividad antioxidante de los tejidos

3. Los datos muestran que se ha conseguido poner a punto la técnica de determinación de la actividad antioxidante total para cada uno de los cinco tejidos estudiados.
4. La lipoperoxidación presenta una correlación muy significativa (hasta  $p < 0,001$ ) con el contenido en grasa de los tejidos a los 90 minutos de incubación, a cualquiera de las concentraciones de  $\text{FeCl}_3$ . Esto lleva a pensar que el daño oxidativo alcanzado a esos niveles es casi únicamente dependiente del contenido en grasa del tejido. Es decir, en esas condiciones, las defensas tisulares intrínsecas son insuficientes y no consiguen paliar el daño debido a los ROS. Esto es probablemente debido a que este grado de estrés oxidativo se aleja mucho de una situación fisiológica.
5. El daño oxidativo presenta una correlación significativa ( $p < 0,05$ ) con la actividad antioxidante del tejido solamente cuando se expone a concentraciones relativamente bajas de  $\text{FeCl}_3$ . Sin embargo, deja de existir cuando son iguales o superiores a 5 mM. Al igual que en el caso anterior, esto puede estar causado por haber excedido el estrés oxidativo presente en el organismo.

A pesar de esto, es necesario incluir estas dos concentraciones (5 mM y 8 mM) en el estudio para cubrir un amplio rango de daño oxidativo con el modelo matemático de respuesta (en el que tan solo se pueden interpolar los datos).

En definitiva, se ha conseguido desarrollar un modelo *in vitro* con unos parámetros válidos para generar estrés oxidativo a lo largo del tiempo, cubriendo incluso rangos superiores a los fisiológicos.

### Conclusión general y perspectivas de futuro

El grado de correlación entre el contenido en grasa de los tejidos, sus defensas antioxidantes y el daño oxidativo indica que los resultados obtenidos son viables y coherentes desde el punto de vista biológico. Gracias a ellos, se podrá desarrollar una única **superficie de respuesta multidimensional** (ver Anexo 1).

Este modelo será capaz de predecir, mediante la interpolación de datos, la lipoperoxidación de **cualquier tejido** expuesto a la oxidación *in vitro* con  $\text{FeCl}_3$  y ácido ascórbico dentro de las condiciones ensayadas. Es decir, con una concentración de  $\text{FeCl}_3$  incluida entre 0 y 8 mM y una incubación entre 0 y 90 minutos.

La utilidad radica en poder anticipar el efecto de cualquier nivel de actividad antioxidante intrínseca del tejido o añadida sin necesidad de llevar a cabo experimentación.

## Conclusions

---

After analyzing the results and discussion, the following conclusions can be drawn.

### Related to the set-up of oxidation *in vitro* model

1. The incubation time below 10 or above 90 minutes does not provide extra information for developing the mathematical model.

2. Concentrations below 0,1 mM or above 8 mM does not provide useful data to optimize future prediction model. Ascorbic acid concentrations must be kept constant and relatively low so as to avoid its antioxidant activity.

### Related to the fat content and antioxidant activity of tissues

3. The data show that the technique to determine the total antioxidant activity has been successfully developed for each of the five tissues studied.

4. Lipoperoxidation presents a very strong correlation (to  $p < 0.001$ ) with fat tissue after 90 minutes incubation at any concentration of  $\text{FeCl}_3$ . This correlation reaches values of  $R = 0.981$  for  $[\text{FeCl}_3] = 8 \text{ mM}$ . All this suggests that oxidative damage reached at these levels is almost solely dependent on the fat tissue, being the intrinsic antioxidant defenses insufficient. Probably, this degree of oxidative stress is far away from the one in physiological conditions.

5. Oxidative damage presents a significant correlation ( $p < 0.05$ ) with the antioxidant activity of tissues only when the sample is exposed to relatively low concentrations of  $\text{FeCl}_3$ . For equal or bigger values than 5 mM there is no longer concentration between the two variables. As in the previous case, this may be consequence of a greater oxidative stress than the physiological one (which can not be controlled by the tissue).

Despite these facts, it is necessary to include both concentrations (5 mM and 8 mM) in the study in order to cover a wide range of oxidative damage which can be included in the prediction mathematical model. Taken all the evidences into account, it is deduced that an *in vitro* model has been suitably developed. It allows to generate a valid oxidative stress over time, covering ranges beyond the physiological parameters.

### Overall conclusion and future prospects

The correlation degree with the tissues fat, their antioxidant defenses and oxidative damage indicates that the obtained results are viable and biologically coherent. These data will serve to create a unique **multi-dimensional response surface** (for more information go to 'Anexo 1').

This model will be able to predict, by interpolation, oxidative damage to lipids for **any tissue** exposed to *in vitro* oxidation with  $\text{FeCl}_3$  and ascorbic acid within the tested conditions. I.e., with a  $\text{FeCl}_3$  concentration included between 0-8 mM and an incubation among 0-90 minutes.

Usefulness relies on the ability of anticipate the effect of any intrinsic or added antioxidant activity without empirical experiments. The most immediate application is the screening *in silico* of antioxidants and doses as a possible study treatment of the great number of diseases in whose pathogenesis is involved the oxidative stress.

## Bibliografía

- Albendea, C.D., Gómez-Trullén, E.M., Fuentes-Broto, L., Miana-Mena, F.J., Millán-Plano, S., Reyes-Gonzales, M.C., et al. García, J.J. (2007). Melatonin reduces lipid and protein oxidative damage in synaptosomes due to aluminium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 21(4), 261-268.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., & Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(17), 7915-7922.
- Andre, A., Chanseaux, E., Dumusois, C., Cabaret, S., Berdeaux, O., & Chardigny, J.M. (2006). Cerebral plasmalogens and aldehydes in senescence-accelerated mice P8 and R1: a comparison between weaned, adult and aged mice. *Brain Res*, 1085(1), 28-32.
- Babior, B.M. (1978). Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes (first of two parts). *N Engl J Med*, 298(12), 659-668.
- Babior, B.M. (1984). Oxidants from phagocytes: agents of defense and destruction. *Blood*, 64(5), 959-966.
- Bijarnia, R.K., Bachtler, M., Chandak, P.G., van Goor, H., & Pasch, A. (2015). Sodium thiosulfate ameliorates oxidative stress and preserves renal function in hyperoxaluric rats. *PLoS One*, 10(4), e0124881.
- Bindoli, A. (1988). Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radical Biology and Medicine*, 5(4), 247-261.
- Bruch, R.C., & Thayer, W.S. (1983). Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 733(2), 216-222.
- Cabrera, T.C., & Serrano, D.S. (2014). Algunos aspectos sobre el estrés oxidativo, el estado antioxidante y la terapia de suplementación. *Revista Cubana de Cardiología y Cirugía Cardiovascular*, 14(1).
- Cadenas, E., & Davies, K.J. (2000). Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(3), 222-230.
- Cadenas, E., Simic, M.G., & Sies, H. (1989). Antioxidant activity of 5-hydroxytryptophan, 5-hydroxyindole, and DOPA against microsomal lipid peroxidation and its dependence on vitamin E. *Free Radic Res Commun*, 6(1), 11-17.
- Crespo, E., Macías, M., García, J.J., Martín, M., Arauzo, M., León, J., et al. Acuña-Castroviejo, D. (1997). Mecanismos de neuroprotección de la melatonina durante el envejecimiento. *Archivos de Neurociencias (Mex)*, 2(4), 247-257.
- Cross, A., & Jones, O. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1057(3), 281-298.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., et al. Milzani, A. (2005). Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev*, 24(1), 55-99.
- Dillard, C.J., Litov, R.E., Savin, W.M., Dumelin, E.E., & Tappel, A.L. (1978). *Effects of exercise, vitamin E, and ozone on pulmonary function and lipid peroxidation* (Vol. 45).
- Fahn, S., & Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Annals of neurology*, 32(6), 804-812.
- Fenton, H.J.H. (1894). LXXIII.- Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *J. Chem. Soc., Trans.*, 65, 899-910.
- Gago-Dominguez, M., Jiang, X., & Castelao, J.E. (2007). Lipid peroxidation and the protective effect of physical exercise on breast cancer. *Medical hypotheses*, 68(5), 1138-1143.
- García, J., Piñol-Ripoll, G., Martínez-Ballarín, E., Fuentes-Broto, L., Miana-Mena, F.J., Venegas, C., et al. Acuña-Castroviejo, D. (2010). Melatonin reduces membrane rigidity and oxidative damage in the brain of SAMP 8 mice. *Neurobiology of aging*, 32(11), 2045-2054.
- Gerschman, R., Gilbert, D.L., Nye, S.W., Dwyer, P., & Fenn, W.O. (1954). Oxygen poisoning and x-irradiation: a mechanism in common. *Science*, 119(3097), 623-626.
- Greenberg, H., Ye, X., Wilson, D., Htoo, A.K., Hendersen, T., & Liu, S.F. (2006). Chronic intermittent hypoxia activates nuclear factor- $\kappa$ B in cardiovascular tissues in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, 343(2), 591-596.
- Gutteridge, J.M. (1984). Ferrous ion-EDTA-stimulated phospholipid oxidation. A reaction changing from



- alkoxyl-radical to hydroxyl-radical-dependent initiation. *Biochem. J*, 224, 697-701.
- Haber, F., & Weiss, J. (1934). *The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts*. Paper presented at the Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences.
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1984). Lipid peroxidation, oxygen radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, 1(8391)(1396-1397).
- Halliwell, B., & Gutteridge, J.M. (1990). Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol*, 186, 1-85.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, 11(3), 298-300.
- Jairam, V., Uchida, K., & Narayanaswami, V. (2012). Pathophysiology of lipoprotein oxidation. In S. Frank & G. Kostner (Eds.), *Lipoproteins- Role in Health and Diseases*: InTech.
- Kaczor, J.J., Hall, J.E., Payne, E., & Tarnopolsky, M.A. (2007). Low intensity training decreases markers of oxidative stress in skeletal muscle of mdx mice. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(1), 145-154.
- Kanner, J., German, J.B., Kinsella, J.E., & Hultin, H.O. (1987). Initiation of lipid peroxidation in biological systems. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 25(4), 317-364.
- Katalinic, V., Modun, D., Music, I., & Boban, M. (2005). Gender differences in antioxidant capacity of rat tissues determined by 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline 6-sulfonate; ABTS) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 140, 47-52.
- Kleikers, P.M., Wingler, K., Hermans, J.J.R., Diebold, I., Altenhöfer, S., Radermacher, K.A., et al. Schmidt, H.H.H.W. (2012). NADPH oxidases as a source of oxidative stress and molecular target in ischemia/reperfusion injury. *Journal of Molecular Medicine*, 90(12), 1391-1406.
- Leonardo-Mendonça, R.C., Concepción-Huertas, M., Guerra-Hernández, E., Zabala, M., Escames, G., & Acuña-Castroviejo, D. (2014). Redox status and antioxidant response in professional cyclists during training. *European Journal of Sport Science*, 14(8), 830-838.
- Levine, M., Padayatty, S.J., & Espey, M.E. (2011). Vitamin C: a concentration-function approach yields pharmacology and therapeutic discoveries. *Adv Nutr*, 2(2), 78-88.
- Madamanchi, N.R., & Runge, M.S. (2013). Redox signaling in cardiovascular health and disease. *Free Radical Biology and Medicine*, 61, 473-501.
- Maestroni GJ, C.V.y.C.A. (1994). Hematopoietic rescue via T-cell-dependent, endogenous granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induced by the pineal neurohormone melatonin in tumor-bearing mice. *Cancer Res*, 54, 2429-2432.
- Masella, R., Di Benedetto, R., Vari, R., Filesi, C., & Giovannini, C. (2005). Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*, 16(10), 577-586.
- Matsumura, A., Emoto, M.C., Suzuki, S., Iwahara, N., Hisahara, S., Kawamata, J., et al. Shimohama, S. (2015). Evaluation of oxidative stress in the brain of a transgenic mouse model of Alzheimer disease by *in vivo* electron paramagnetic resonance imaging. *Free Radic Biol Med*, 85, 165-173.
- Millán-Plano, S., Piedrafita, E., Miana-Mena, F.J., Fuentes-Broto, L., Martínez-Ballarín, E., López-Pingarrón, L., et al. García, J.J. (2010). Melatonin and Structurally-Related Compounds Protect Synaptosomal Membranes from Free Radical Damage. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(1), 312-328.
- Miller, D.M., Buettner, G.R., & Aust, S.D. (1990). Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 8(1), 95-108.
- Miller, E., Morel, A., Saso, L., & Saluk, J. (2014). Melatonin Redox Activity. Its Potential Clinical Application in Neurodegenerative Disorders. *Curr Top Med Chem*.
- Miyaniishi, K., Hoki, T., Tanaka, S., & Kato, J. (2015). Prevention of hepatocellular carcinoma: Focusing on antioxidant therapy. *World Journal of Hepatology*, 7(3), 593-599.
- Molnár, G.A., Zsóka, M.E., András, S.I., Kun, S., Sélley, E., & Wittmann, I. (2015). Tyrosine isomers and hormonal signaling: a possible role for the hydroxyl free radical in insulin resistance. *World Journal of Diabetes*, 6(3), 500-507.
- Moslen, M.T. (1994). Reactive oxygen species in normal physiology, cell injury and phagocytosis *Free Radicals in Diagnostic Medicine* (pp. 17-27): Springer.

- Muriel, P. (2009). Role of free radicals in liver diseases. *Hepatology international*, 3(4), 526-536.
- Orden 21118, BOE núm. 207. (29 de agosto de 1979). 20221-20247.
- Pastor, N., Weinstein, H., Jamison, E., & Brenowitz, M. (2000). A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *Journal of molecular biology*, 304(1), 55-68.
- Puukila, S., Bryan, S., Laakso, A., Abdel-Malak, J., Gurney, C., Agostino, A., et al. Khaper, N. (2015). Secoisolariciresinol diglucoside abrogates oxidative stress-induced damage in cardiac iron overload condition. *PLoS One*, 10(3), e0122852.
- Radak, Z., Chung, H.Y., Naito, H., Takahashi, R., Jung, K.J., Kim, H.J., & Goto, S. (2004). Age-associated increase in oxidative stress and nuclear factor kappaB activation are attenuated in rat liver by regular exercise. *FASEB J*, 18(6), 749-750.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26(9), 1231-1237.
- Rojas-Rivera, J., Ortiz, A., & Egido, J. (2012). Antioxidants in Kidney Diseases: The Impact of Bardoxolone Methyl. *International Journal of Nephrology*, 2012, 11.
- Rowley, D., & Halliwell, B. (1983). Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals in the presence of copper salts: a physiologically significant reaction? *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 225(1), 279-284.
- Stadtman, E.R. (2004). Role of oxidant species in aging. *Current medicinal chemistry*, 11(9), 1105-1112.
- Supinski, G.S., & Callahan, L.A. (2007). Free radical-mediated skeletal muscle dysfunction in inflammatory conditions. *Journal of applied physiology*, 102(5), 2056-2063.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 39(1), 44-84.
- Valko, M., Morris, H., & Cronin, M. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. *Current medicinal chemistry*, 12(10), 1161-1208.
- Venereo Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de medicina militar*, 31(2), 126-133.
- Wilhelm, J. (1989). Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Universitatis Carolinae. Medica. Monographia*, 137, 1-53.
- Zarkovic, K. (2003). 4-hydroxynonenal and neurodegenerative diseases. *Molecular aspects of medicine*, 24(4), 293-303.
- Zhu, X., Zuo, L., Cardounel, A.J., Zweier, J.L., & He, G. (2007). Characterization of in vivo tissue redox status, oxygenation, and formation of reactive oxygen species in postischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal*, 9(4), 447-455.